

課題番号 4

寿命因子TORC1が制御する姉妹染色分体接着の制御機構の解明

[1] 組織

代表者：丑丸 敬史
(静岡大学理学部生物科学科)
対応者：田中 耕三
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：宅間 恒行
(静岡大学大学院総合科学技術研究科)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

分裂期における染色体の分離、凝縮等の動態の詳細な分子機構が明らかになってきているが、細胞がストレス（例えば栄養源飢餓）に曝された場合、その分裂期進行がどのように影響を受けるかに関する研究は未解明の課題である。

老化・寿命に深く関与する TORC1 (target of rapamycin complex 1) (ヒトでは mTORC1) プロテインキナーゼ複合体は栄養・成長ホルモンで活性化し同化作用を促進し細胞成長を促す反面、細胞・個体の老化を促進する (Kapahi et al. 2010 *Cell Metab*)。そのため、TORC1 の特異的阻害剤ラパマイシンはマウスの最大寿命を延長することができる (Harrison et al. 2009 *Nature*)。栄養源飢餓時には TORC1 は不活性化し細胞の成長と増殖を下方制御する。代表者は、酵母 TORC1 が G1/S 期進行を促進すること、DNA 損傷チェックポイントの保持に必要なことを見出し (Moshed et al. 2020 *BBRC*; Miyamoto et al.

BBRC 2019)、さらに、東北大学加齢医学研究所の田中耕三教授との共同研究で、TORC1 不活性化が紡錘体形成チェックポイントによる分裂中期停止を解除してしまうことを明らかにした (Yamada et al. 2022 *iScience*、共同研究成果)。興味深いことに、この停止解除は、ヒト細胞ではユビキチンリガーゼ APC/C-Cdc20 依存的に起こったのに対して、酵母では異常な APC/C-Cdh1 経路 (Toda et al. 2012 *Cell Div*; Nagai and Ushimaru 2014 *Cell Signal*) の活性化によるものであった。

その一方、TORC1 は栄養源飢餓で不活性化し細胞成長を停止させる。代表者は、それに加えて DNA ダメージ、タンパク質毒性ストレスも TORC1 活性を低下させることを明らかにした (Ueda et al. 2019

Cell Signal; Suda et al. 2019 *BBRC*)。これらのことは、TORC1 が細胞内環境をモニターし適切に細胞の成長・増殖を制御するマスターレギュレーターであることを示す。

さらに代表者は予備的研究において、分裂期進行における重要なタンパク質が飢餓時の TORC1 不活性化により大規模に失われることを見出した (未発表データ)。中でも、姉妹染色分体を繋ぎ止める働きをするコヒーシンに着目した。コヒーシンは Scc1、Smc1、Smc3、Scc3、Pds5 からなる複合体である。環状のタンパク質複合体であるコヒーシンは、分裂中期までトポロジカルに姉妹染色分体を内部に抱え込むように接着させているが、分裂後期開始時に分裂期プロテアーゼであるセパラゼ Esp1 により Scc1 が切断されることでコヒーシンリングが開裂し姉妹染色分体が分離可能になる (図 1)。そのキースサブユニットである Scc1 がラパマイシン処理により失われることを発見したが、その場合には姉妹染色分体の接着が解除されてしまう危険性がある。

以上の知見を踏まえて、本共同研究では、ラパマイシン処理による TORC1 の不活性化後の Scc1、およびその代謝に関わる因子 (セパラゼ、セキュリン) の動態を検証した。

本研究は、所内対応者の田中耕三教授と適宜メール等により打合わせを行いつつ行った。

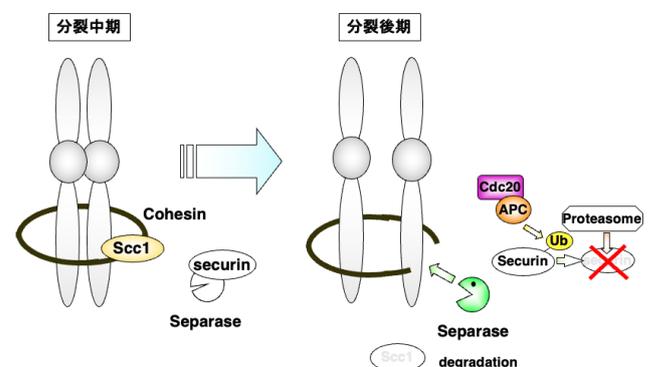


図1. コヒーシンサブユニットScc1は分裂後期開始時にセパラゼにより切断を受け分解されることでコヒーシンが開裂し姉妹染色分体が分離可能になる。分裂中期にはセパラゼはセキュリンによる結合阻害を受けているが、分裂後期開始時にセキュリンがユビキチン化され除去されることで活性化する。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

- 1) セキュリン、セパララーゼ、コヒーシンへの影響
代表者は先行する共同研究で、分裂中期までセパララーゼを結合阻害するセキュリタンパク質 Pds1 およびコヒーシン Scc1 (図1) がラパマイシン処理後に失われることを報告した (Yamada et al. 2022 *iScience*、共同研究成果) (図2)。当初、コヒーシンはセパララーゼ Esp1 により切断され失われるものと予想したが、そのセパララーゼもラパマイシン処理による TORC1 不活性化により急激に減少した (図2A)。プロモーターのシャットオフ実験から、この急激な現象は、ラパマイシン処理後に分解が促進されることが原因であることが半明した (図2B)。

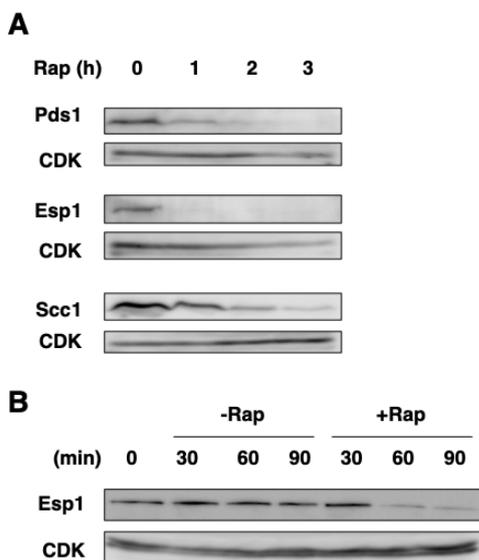


図2. TORC1不活性化によるセキュリンPds1、セパララーゼEsp1、Scc1の減少。

さらにこのセパララーゼの減少は、セパララーゼの切断活性を欠いた esp1-CA 変異体で大きく抑制された。このことは、セパララーゼの自己切断が分解の一因になっており、これが TORC1 不活性化で促進されたことを示唆する。以上の結果から、セキュリンの分解が TORC1 不活性化で促進されたため、活性化したセキュリンが自己切断して減少したものと推測される。しかしながら、ラパマイシン処理後のセパララーゼの減少は、Scc1 が Esp1 により切断分解されるという仮説と矛盾する。さらに、Scc1 が Esp1 に比べてよりゆっくりと減少することもこの仮説に反する。

- 2) セパララーゼ切断に依存しない Scc1 の分解

上記の結果を受けて、代表者は、TORC1 不活性化後の Scc1 の減少がセパララーゼに依存しないのではないかとこの仮説を立て、それを検証した。

Scc1-RRDD はセパララーゼによる切断箇所に変異をもち切断を受けない変異体である。その変異体においても発現のシャットオフ後に減少が見られ、またその減少がラパマイシン存在下でわずかながら促進された (図3)。このことは、Scc1 がセパララーゼ非依存的に分解されること、その分解が TORC1 不活性化により促進されることを示す。

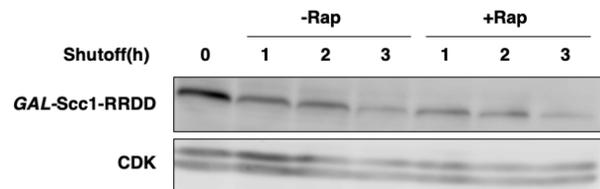


図3. Scc1はセパララーゼ非依存的に分解を受ける

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、TORC1 活性低下が染色体分配不全を増加させることを示唆し、アンチエイジング薬として使用されているラパマイシンの使用が正常細胞において染色体の不安定性をもたらす細胞のガン化を増加させる危険性があることを指摘する。さらに、本研究は TORC1 活性が低下する老化細胞での分裂期が不安定になる可能性を示唆する。このように、本研究は、TORC1 を基軸にした新たなストレス、老化、がん、染色体を絡めた学際的な研究分野の創生を提示する。本研究を起爆剤として今後より一層の関連研究の発展を目指す。

[4] 成果資料 (査読付き英語原著論文、全て代表者が責任著者)

1. Yamada, ..., [Ushimaru*](#) (2022) TORC1 inactivation promotes APC/C-dependent mitotic slippage in yeast and human cells. *iScience*. 25:103675.
2. Suda, ..., [Ushimaru*](#) (2019) TORC1 regulates autophagy induction in response to proteotoxic stress in yeast and human cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 511, 434-9.
3. Ueda, ..., [Ushimaru*](#) (2019) TORC1, Tel1/Mec1, and Mpk1 regulate autophagy induction after DNA damage in budding yeast. *Cell Signal*. 62:109344.
4. Miyamoto, ..., [Ushimaru*](#) (2019) TORC1 regulates the DNA damage checkpoint via checkpoint protein levels. *Biochem Biophys Res Commun* 510, 629-35.
5. Nagai, ..., [Ushimaru*](#) (2018) Cdh1 degradation is mediated by APC/C-Cdh1 and SCF-Cdc4 in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 506, 932-8.
6. Nagai, ..., [Ushimaru*](#) (2014) Cdh1 is an antagonist of the spindle assembly checkpoint. *Cell Signal* 26, 2217-22.